シンポジウム

BRM-基礎医学の立場から

BRM

—基礎医学の立場から—

徳永 徹

Summary

本稿は、第4回皮膚悪性腫瘍学会総会シンポジウム「BRMの現状と展望」において、5名の演者の先生方が臨床の立場から種々のBRMについて紹介されたことを受けて、基礎の立場から総説的に行った報告の概要である。その内容の要点は以下の如くである。

I. BRMの定義と背景

II. サイトカインについて

(1)一般的な性質, (2)サイトカインの作用する場の問題, (3)サイトカインの調節因子

III. 合成BRM——BCG, 核酸製剤を中心に

IV. 自然界由来物質——BCG核酸製剤を中心に

V. おわりに——BRMの基礎研究

I. BRMの定義と背景

1975年、米国の国立癌研究所（NCI）のDivision of Cancer Therapy（DCT）に設けられたインターフェロン（IFN）のワーキンググループを基盤に、1978年、新しくBRMに関する委員会（座長：E. Mihich）が作られ、BRMプログラムが発足した。この委員会が定めた定義によると、BRM（biological response modifiers）とは「腫瘍細胞に対する宿主の生物学的応答を修飾することにより、治療効果を招来せしめる物質または方法」である¹⁾。

BRMとは、用語本来の意味からすると、癌に対する生体応答の調節に限らず、すべての生体応答に対する調節制御物質の総称として用いられる術語であろう。しかし実際には、この用語は癌に対する生体応答のmodulatorsに対してだけ用いられることが多い。

これはちょうどリンホカインやサイトカインという用語が、本来の意義から言うと、前者はリンパ球が産生するすべての物質、後者はおよそ細胞が産生するすべての物質の総称とみなされるのに、実際にはこれらのうち免疫応答に関する物質についてだけ、そう呼ばれているのに類似している。つまりこれらの用語の定義には、それが作られ使用されるに至った歴史的背景

* Tohru TOKUNAGA：国立予防衛生研究所（〒141 東京都品川区上大崎2-10-35）

が強く影響を与えている。

BRMの歴史的背景としては、1970年代に世界的な規模で繰り広げられたいわゆる癌の免疫療法に関するrandomized controlled studyが記憶に新しい。これらの試みは、腫瘍内局所投与など特定の限られた場合を除き、期待に反して有意な効果を示すに至らなかった。さらにヒトの癌や自然発生した動物の癌では腫瘍特異抗原を確認することが困難なことも明らかとなり、一方癌抗原特異的キラーT細胞のほかに極めて多様な特異的・非特異的な抗癌エフェクター機構や、またそれらを調節し、あるいは阻害する機構の存在が知られるようになった。そして癌抗原に特異的な免疫応答だけでなく、この多様な抗癌生体応答を治療に役立てようという試みが注目されるようになった。

このような生体応答の修飾は、以下のようないくつかの方向からのアプローチによりもたらされると考えられている。

- 1) 宿主防衛に関与するエフェクター機構やメディエーターの増強や回復、あるいは宿主にとって有害な生体応答の除去による抗腫瘍応答の強化。
- 2) 自然の、あるいは合成したエフェクターやメディエーターの投与による宿主防御能の増強。
- 3) 腫瘍細胞の修飾により、強い宿主反応を誘導し、あるいは腫瘍細胞自身の感受性を高めることによる宿主応答の増強。
- 4) 腫瘍細胞の形質転換の抑制、あるいは分化成熟の増強。
- 5) 癌治療に伴う生体の損傷に対する宿主の耐久力の増強。

米国のBRMプログラムにおいてBRMとして位置づけられたものの種類は、表1に示すように、極めて多岐にわたる。これらの物質は、腫瘍抗原等を除き、ほとんど全てが抗癌生体応答を修飾するだけでなく、用語本来の意味でのBRMである。したがって、その使用に当たっては、常に癌だけでなく、生体機能全般に与える影響についての配慮と注意が必要であることも、BRMの特色の一つと言えるだろう。

II. サイトカイン

1. 一般的な性質

初期のBRM研究と比較して、現時点の研究の特色の一つは、初期におけるBRMの多くが細菌や植物等自然界に由来する物質であったのに比べ、現時点でのそれは、化学合成したもの、あるいは遺伝子工学的に作製されたものが多いことである。

この傾向は特にサイトカインについて顕著である。サイトカインとは、免疫担当細胞が産生する生理活性をもつ糖タンパクのうち免疫グロブリンを除く物質の総称で、極めて微量（通常 10^{-10} ～ 10^{-12} M）で有効性を示す。それぞれのサイトカインに固有のレセプターと結合して作用し、したがって標的となる細胞はそれぞれのサイトカインに特異的で、その点ホルモンと類似している。

この数年間のサイトカイン研究の進歩は目ざましく、表2のようにサイトカインの遺伝子が次々にクローニングされ、その全塩基配列が解明され、量産も可能となり、生物活性についても多くの情報が得られるようになった。

これらのサイトカインの個々について述べる余裕はないが、共通の特徴として次のような諸

表 1 BRMの種類

1) 免疫の増強、調節、回復作用をもつ物質*
2) インターフェロンおよびその誘導物質
3) 胸腺ホルモン、胸腺因子
4) リンフォカイン、モノカイン、その他のサイトカイン
5) 単クローン抗体
6) 腫瘍抗原
7) エフェクター細胞
8) 癌化抑制因子**
9) その他***
* たとえば、BCG等の細菌及び菌体成分、MDP、 レバミゾール等の合成剤、レンチナン等の多糖。
** たとえば、レチノイド、分化因子、成熟因子、DMSO。
*** たとえば、同種免疫、骨髄移植など。

表 2 主要なヒトの遺伝子組換え型サイトカイン

インターロイキン (IL)	IL-1
	IL-2
	IL-3
	IL-4 (=BSF ₁)
	IL-5
	IL-6 (=BSF ₂ =TRF)
	IL-7
インターフェロン (IFN)	IFN- α
	IFN- β
	IFN- γ
集落形成因子 (CSF)	G-CSF
	M-CSF
	GM-CSF
腫瘍壊死因子 (TNF)	TNF- α
	TNF- β (=LT=OH-1)

点を指摘できよう。(i)各サイトカインの生物作用が一般に極めて多様である。たとえばIL-1は、リンパ球の増殖や分化を促すだけでなく、肝細胞に作用して急性期蛋白を産生させ、脳に作用して発熱やACTHの分泌を増加させる。(ii)異なるサイトカインが同一の細胞に作用し同じ活性を示すことが少なくない。たとえば、IL-1、IL-2、IFNは共にNK活性を増強する。(iii)サイトカイン相互間に連鎖作用があり、サイトカインネットワークを形成している。たとえば、マクロファージが産生するIL-1の刺激を受けて、Tリンパ球が産生するIL-2、IFN- γ 、CSFは、さらにマクロファージのIL-1、TNF等の産生を増強する。(iv)このようなネットワークには、フィードバック調節作用も含まれ、また内分泌系や脳神経系との間の相互作用も認められる。たとえば、感染などによりマクロファージからのIL-1産生が増強すると、下垂体に作用してACTHや β -endorphinの分泌が促され、血中グルココルチコイドが増量し、これが神経・内分泌系にフィードバックされるだけでなく、免疫系にも影響してIL-1の産生を抑制する。

2. サイトカインの作用する場の問題

サイトカインは一般に極めて微量で作用すると前述したが、しかしその作用は一般に産生細胞周辺に限られており、原則として流血中に高濃度に見出されることはない。前項に挙げたようなサイトカインの作用の多様性などを考えれば、そのことは生体のホメオスターシスの維持にとって必要なことと思われる。

大量の純粋なサイトカインの作製が可能となり、癌患者への多量の静脈投与も可能となったが、当初の熱い期待に反してその効果が必ずしも上がらないのは、局所的に働くというサイトカイン本来の性質が影響していると思われる。IL-2を例にとると、血中にはIL-2インヒビターが存在しており、高単位のIL-2活性は速やかに抑制されるらしい²⁾。

また本来標的となるべき細胞が、臓器や組織によってはレセプターを欠如しているために、反応し難い場合がある。その典型的な例として、マウスの肺マクロファージに関する筆者らの実験を紹介する。

一般にマクロファージは細菌性リポ多糖 (LPS) により活性化され、癌細胞傷害性を示すようになるが、マウスの肺マクロファージは腹腔等のマクロファージと異なり、LPSによって活性化されない。しかし試験管の中で肺マクロファージを微量のIFN- γ と共存せしめると活性化されること、この活性化には順序があり、予めLPSで処理したのちIFN- γ を加えても活性化は見られず、IFN- γ で2時間前処理するとLPSにより活性化されるようになることを見出した³⁾。この理由は、マウス肺マクロファージはLPSに対するレセプターを発現していないが、IFN- γ の前処理により、それを発現するためであることが分かった。

マウスのB16メラノーマは静脈注射すると肺に多数の黒色の癌腫を形成するため、その数をかぞえることができる。B16の注射と同時にLPSあるいはIFN- γ を投与しても、肺に形成される黒色腫の数はほとんど影響が見られないが、LPSとIFN- γ の両者を投与すると著明な減少が見られた。この作用は、相加効果ではなく、all or noneに近い様相を呈し、この両者の併用により肺マクロファージが活性化され、そのため腫瘍の形成が抑えられたものと考えられた。

上記の事実から、サイトカインの抗癌作用について次のような示唆が与えられる。

- (i) BRMとしてのサイトカインは、他のBRMとの併用により始めて効果を示す場合がある。
- (ii) その場合にも、複数のBRM投与のsequenceが大切であり、それを誤ると無効である。
- (iii) いずれにせよBRMの使用は、標的となる臓器等、場の特性を十分に踏まえた上で、理論に叶う方法で行うことが重要である⁴⁾。

3. サイトカインの調節因子

前にも述べたように、大量のヒト組換え型IL-2を静脈注射したのち、血中のIL-2活性は速やかに消失する。IFNの場合にも速やかに消失するが、その活性半減は時間単位であるのに、IL-2の場合は分単位で減衰する。この理由の一つは、血中にIL-2インヒビターが存在するためと思われる。

マウスの脾細胞を試験管の中でコンカナバリンA (ConA) で刺激すると、最初の2日間は上清中にIL-2活性が見出されるが、4~5日後にはIL-2インヒビター活性が強く認められる。筆者らはこのインヒビターを産生するT細胞ハイブリドーマを得ることができ、その性状が分子量約1.5万の熱に比較的安定な蛋白であることを認めた²⁾。このようなリンフォカインとしてのインヒビターは、血中では別の蛋白と複合体を形成して機能するものと考えられるが、最近IL-2インヒビターについてのいくつかの報告が相次いでおり、複数のインヒビターの存在

が考えられる。やがてそれらの遺伝子のクローニングも行われ、物質や作用機序の全貌が解明されると思われる。

いささか余談になるが、IL-2 インヒビターの研究中に、疾患によっては血中に極めて高濃度のIL-2 レセプターが存在することを見出した。すなわち、フリーのIL-2 レセプターの高感度アッセイ法を確立することによって種々の疾患の患者血中のフリーのIL-2 レセプターの測定を行ったところ、特に成人T細胞白血病(ATL)の患者ではそれが著しく高いこと、またそのレベルは病態とある程度併行していること、などが明らかとなった⁵⁾。IL-2 レセプターは、 α 鎖と β 鎖の2本のペプチド鎖から構成されており、IL-2 に対して高いアフィニティーをもつのは β 鎖であることが知られているが、 α 鎖の方はいくつもの単クローン抗体が得られ、その遺伝子の全構造も明らかとなったのに反し、 β 鎖の方は未だ明らかにされていない。上述の血中のフリーのIL-2 レセプターも α 鎖に対する単クローン抗体により検出されるもので、フリーの β 鎖の存在などは明らかでない。しかし最近我々を含め、いくつかの研究室で β 鎖に特異的な単クローン抗体の作製に成功しており、その全構造の解明と共に、IL-2 インヒビターとしての β 鎖の役割も明らかになることが期待される。

以上IL-2 インヒビターの例について述べたが、それぞれのサイトカインについて、その制御機構を明らかにすることは、サイトカインの応用面からも必要なことと考えられる。

III. 合成BRM

化学合成の技術が進歩し、自然界に由来する種々のBRMが化学的に合成できるようになったが、その顕著な例の一つは、細菌細胞壁のアジュバント活性物質であるMDP (N-acetyl-L-alanyl-D-isoglutamine)であろう。この物質は抗原と共に油中水型エマルジョンの形で混じて投与すると、血中抗体価の上昇や、遅延型アレルギー反応の増強をもたらすことが、わが国の学者を中心に明らかにされた。多数のMDPの誘導体についても広範な検討が行われているが、最近筆者のグループは、その一つ6-o-(2-tetradecyl-hexadecanoyl)-MDP (B30-MDP)がオイルの添加無しに強い抗腫瘍免疫のアジュバント活性を示すことを見出した⁶⁾。表3の成績は、モルモットの同系肝癌(line 10)での実験結果であるが、コバルト照射line 10細胞(10^6)を磷酸緩衝液、MDP, B30-MDP (5 μ g)あるいはBCG生菌(10^8)と混じて1週おきに2回免疫し、その1週間後に 10^6 のline10生細胞をチャレンジした結果である。B30-MDPは、BCGにくらべ局所の変化ははるかに少なかったが、免疫の誘導効果はBCGのに劣らなかった。この結果の臨床応用にはさらに種々の検討が必要であるが、その手技が極めて簡単であることから、不活化自家癌細胞を用いて再発予防への応用が期待されよう。

IV. 自然界由来物質

自然界に由来する物質の多くが、遺伝子組換え型や化学合成型に変わりつつあるのは、この時代の大きな趨勢であるが、しかし微生物や動植物などに由来する天然物にもそれなりの長所があり、科学的方法論の進歩に伴い、改めて見直されるものも少なくない。

天然物の多くは多数の異なる物質の複合体であり、それが適切に配合されている場合には強い生物活性を示す。その顕著な例の一つとしてBCGを挙げることができる。

**表 3 . X線照射腫瘍細胞による抗腫瘍免疫の誘導に及ぼす
B30-MDPのアジュバント効果**

免疫原	個々の動物の生存日数	治療率
ナシ	53,53,60,61,64	0%
腫瘍細胞のみ*	49,50,57,58,63	0
腫瘍細胞+MDP	53,53,53,61,68	0
腫瘍細胞+B30-MDP	>100,>100,>100,>100,>100 >100,>100,>100,	100
腫瘍細胞+BCG	>100,>100,>100,>100,>100	100

* X線照射line-10細胞(10^6)をstrain2モルモットに1週おきに皮下接種し、さらにその7日後に 10^6 のline-10細胞を皮下にチャレンジし、100日目までに腫瘍の生着と動物の生存を観察した。
照射腫瘍細胞と混合したMDP, B30-MDPの量はそれぞれ50 μ g,
BCGは 10^8 生菌である。

BCGは結核予防ワクチンとして開発された弱毒生菌であるが、その細胞壁は厚い脂質膜に覆われており、その骨格を形成するのが前述のMDPである。この脂質膜は複雑な構成を示し、MDPの効果を著しく増強する糖脂質も共存している。さらに細胞壁全体としてマクロファージ中で消化され難くファゴソーム中に長期間persistするためマクロファージは強く活性化される。またこの細胞壁脂質層にはBCGタンパクが包埋されており、その抗原決定基をTリンパ球が認識し、遅延型アレルギーが成立する。このリンパ球が産生するIFN- γ も加わって、マクロファージはさらに活性化し、貪食したBCGを殺菌するだけでなく、もし近傍に癌細胞が存在すれば、それを傷害破壊する。BCGに腫瘍を破壊退縮させる効果があるのは、このようなマクロファージの活性化に依るものであり、もし破壊された癌細胞が癌関連抗原を発現していれば、腫瘍特異免疫を成立させるためにも、BCG細胞壁は強力なアジュバント効果を示すことになる。

この種のagentとして、BCGは今日まで知られた天然物中最強の活性をもつと考えられるが、これは種々の活性物質の配合の妙味によるものであろう。しかし一方、BCG生菌が加熱死菌等にくらべ著しく効果が強い理由など、その作用機序について明らかでない部分もあり、またこの細胞中には不要な物質や副作用の原因となる物質も含まれており、その改良や投与法の工夫など、種々の研究が続けられている。

筆者らは10数年前、BCGより有効な水溶性画分を抽出する目的で、種々試行を重ねた結果、その核酸画分に強い活性があることを見出し、その画分をMY-1と名付けた。MY-1の化学組成は、98%が核酸(DNA 70.0%, RNA 28.0%)であり、タンパク質はアミノ酸アナライザー測定で0.15%、中性糖含量はグルコース0.20%のみで、細胞壁成分であるジアミノピメリン酸は検出限界(0.01%)以下であった。分子量は $2 \sim 4 \times 10^5$ 、分子の形状は変性一本鎖DNAである。DNAの塩基組成は、GC比が69.8%であり、ミコバクテリアのDNAの特性を示している⁷⁾。

このMY-1 (100 μ g)を、種々のマウスやモルモットの同系腫瘍の腫瘍中に連続投与することにより、腫瘍の退縮が認められた。この効果は、MY-1をあらかじめDNaseで処理すると失われ、RNaseで処理するとむしろ増強された。因みに、DNase処理後のMY-1は、97.0%がRNAであり、RNase処理後は97.0%がDNAであったので、有効画分はDNAであることが知られた。さらにMY-1は、マウス白血病(EL 4, P 815, L 1210)に対し全身的に投与した場合にも、局所投与の場合に比べて効果は弱いが有意の抑制を示した。また、Lewis肺癌を後足蹠に接種し、その9日後に後肢を切断したマウスに見られる腫瘍の転移に対しても、MY-1の連続静脈注射が有効であった⁸⁾。

MY-1の100 μ gを腹腔投与したマウスでは、1日後にNK活性の強い増強が認められた。この活性はMY-1の用量に依存しており、この場合にもDNase処理を行ったMY-1には活性は認められなかった。一方、マウス脾細胞をMY-1 100 μ g/mlとともに培養すると、6時間後には極めて高いNK活性を示した。この培養上清中には、ウイルス(VSV)のプラーク形成抑制作用により検出されるインターフェロン(IFN)活性と、正常マクロファージを活性化するMAF活性とが検出された。この培養上清中のIFN活性は、抗IFN- α/β 抗体により中和され、MAF活性は抗IFN- γ 抗体により中和された。MY-1をDNaseで処理するとすべてこれらの活性が失われた。試験管内でのこのような活性は、ポリGCなどの合成DNAを用いても認められた¹⁰⁾。

このようなNKの増強、IFNの産生、マクロファージの活性化などの作用をもつ核酸としては、2重鎖の合成RNA、とくにポリI:Cが有名である。筆者らは対象としてポリI:Cを用いたが、上述の作用に関してはMY-1よりポリI:Cのほうがむしろ強い傾向があった。しかし、ポリI:Cは毒性が強く、実用化は無理と考えられているが、MY-1のマウスの対する急性毒性は静脈内投与でもLD₅₀が0.5g/kg以上であり、ラットでは300mg/kg以上である。亜急性、慢性毒性も弱く、神経系、循環系にも異常を認めない。既に本シンポジウムの座長である石原博士や池田教授を中心に、皮膚科のグループによる臨床試験が行われており、悪性リンフォーマや成人T細胞白血病の皮膚症状等にも有効例が報告されつつある。

以上は筆者らの研究の中から1例を示したに過ぎないが、自然界由来の種々の既知あるいは未知の物質の中から、さらに興味あるBRMが数多く見出されるであろうことは疑いない。

V. おわりに

かつて筆者は「BRMの現状と将来への展望」と題するアンケートに対する答えとして、BRM研究には何が必要か?という短文を書いたことがある¹¹⁾。ここではそれをそのまま引用して、基礎の研究者の立場からの結論としたいと思う。

「BRMの作用機構は明らかでなくとも、効きさえすればいいではないか」という声をしばしば耳にする。患者の苦痛を考えるとその発言の気持ちはわかるが、しかしその考えはBRM研究の将来をスポイルするものであろう。つまり、経験的に有効なものを探すとなると、しかもその効果は人体でないとわからないということになると、百鬼夜行となる恐れがある。筆者は、作用機序を現代科学のもっとも進んだレベルで明らかにすることが人体での安全性を確認することとともに、BRM研究にとって最も重要であると思う。

さらに有効性の確認には、かつての免疫療法トライアルが努力したように、きちんとした対照をおいた効果判定を行うべきである。しかもそれは、かつてのトライアルの教訓を生かして、標的となる癌を選択し、場の特性を利用し、他療法はもとよりBRM同士の合理的な併用を行うなど、種々の工夫をする必要がある。そのような視点でBRMの開発をより容易に進められるよう、現行制度の改善を検討してみることも必要であろう」。

文 献

- 1) 徳永 徹, 片岡哲朗: 米国のBiological Response Modifiers (BRM) プログラムについて, 免疫薬理, **2**: 156-162, 1984.
- 2) 本多三男, 三谷満昭, 横田恭子, 徳永 徹: IL-2 インヒビター. 代謝, 臨時増刊免疫'86, **23**: 105-112, 1986.
- 3) Akagawa, K. S., Tokunaga, T.: Lack of binding of bacterial lipopolysaccharide to mouse lung macrophages and restoration of binding by γ -interferon. J. Exp. Med., **162**: 1444-1459, 1985.
- 4) 徳永 徹: 免疫学の癌治療への応用の展望. 癌と化学療法, **11**: 1358-1366, 1987.
- 5) Honda, M., Yamamoto, N., Nagao, S., Tokunaga, T.: High levels of soluble interleukin 2 receptors released from human retrovirus- infected cells. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **78**: 889-893, 1987.
- 6) Kataoka, T., Tokunaga, T.: A synthetic adjuvant effective in inducing antitumor immunity. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **79**: 817-820, 1988.
- 7) Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., Makiguchi, N., Suganuma, T.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. J. Natl. Cancer Inst. **72**: 955-962, 1984.
- 8) Shimada, S., Yano, O., Inoue, H., Kuramoto, E., Fukuda, T., Yamamoto, H., Kataoka, T., Tokunaga, T.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II Effects on various syngeneic mouse tumors. J. Natl. Cancer Inst., **74**: 681-688, 1985.
- 9) Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., Tokunaga, T.: *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- α/β and- γ with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **79**: 866-873, 1988.
- 10) Tokunaga, T., Yamamoto, S., Namba, K.: A synthetic single-stranded DNA. poly (dG, dC) . induces interferon - α/β and- γ , augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) , **79**: 682-686, 1988.
- 11) 徳永 徹: BRMの現状と将来への展望, 治療学, **1**: 89-90, 1988.
引用文献は, 本報告の性質上, 筆者らの仕事に限らせていただいたが, 最近刊行されたBRMに関連する雑誌の特集を/ 2, 3 紹介しておく^{12),13),14)}.
- 12) 特集「BRM-現状の評価における問題を追求する」, 治療学, **20**, (1), 1988.
- 13) 特集「BRM研究の現状と問題点」BIOTHERAPY, **1**(1), 1987.
- 14) 特集「サイトカインによる治療の現状」 Medical Immunology, **16**: 179-238, 1988.